ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1984 THESE : 60

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES ISOENZYMES DES PHOSPHATASES ALCALINES DES OVINS

THESE

pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1984
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Florence, Henriette, Françoise HERBERT
Née le 4 mars 1960,à PARIS (VIII[e])

MEMBRES DU JURY

Président : Monsieur DOUSTE-BLAZY
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : Monsieur RICO
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur BEZILLE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1984 THESE : 60

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES ISOENZYMES DES PHOSPHATASES ALCALINES DES OVINS

THESE

pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1984
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Florence, Henriette, Françoise HERBERT
Née le 4 mars 1960,à PARIS (VIII^e^)

MEMBRES DU JURY

Président : Monsieur DOUSTE-BLAZY
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : Monsieur RICO
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur BEZILLE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE
Directeur honoraire ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires ..... MM. BRIZARD
..... SAURAT
..... GODFRAIN

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire : ..... Mme BURGAT-SACAZE
Maître-Assistant ..... M.PETIT

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... MM.RICO
Professeur sans chaire ..... BRAUN
Maître-Assistant Agrégé ..... BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... MM. PAVAUX
Maître-Assistant agrégé ..... LIGNEREUX
Maître-Assistant Agrégé ..... SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie Générale - Anatomie appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE,PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... MM. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie - Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... MM. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... CABANIE
Maître-Assistant Agrégé ..... MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... MM.LABIE
Maître de Conférences ..... EECKHOUTTE
Maître-Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires
d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... MM. DORCHIES
Maître de Conférences ..... FRANC
Maître-Assistant Agrégé ..... DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie - Parasitologie externe -
Dermatologie Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES
EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... MM. LESCURE
Professeur sans chaire ..... GUELFI
Maître-Assistant Agrégé ..... REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... MM. TOURNUT
Maître de Conférences ..... BEZILLE
Maître-Assitant ..... JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail
et des animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... MM. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... GENEVOIS
Maître-Assistant Agrégé ..... AUTEFAGE
Maître-Assistant ..... FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale - Radiologie -
Technique chirurgicale - Anesthésiologie - Pathologie Chirurgicale -
Traumatologie - Podologie orthopédique - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... MM. FERNEY
Professeur sans chaire ..... ROYAL
Maître-Assistant ..... BERTHELOT

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle -
Sémiologie et propédeutique - Pathologie de la Reproduction -
Obstétrique et pathologie du nouveau-né - Clinique -
Consultation Itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... MM. CHANTAL
Maître-Assistant ..... PICAVET
Maître-Assistant ..... LACHERETZ

Epidémiologie - Maladies Contagieuses
Zoonoses - Législation Sanitaire - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... MM. LAUTIE
Maître de Conférences ..... EUZEBY
Maître-Assistant ..... MILON

Microbiologie - Immunologie -
Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... MM. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... DARRE
Maître-Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur - Zootechnie et économie générales -
Ethologie appliquée, Sciences, Techniques, Economie de l'Elevage et des Productions Animales -
Insémination artificielle - Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... MM. FALIU
Professeur sans chaire ..... GRIESS
Maître-Assistant ..... ENJALBERT

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET ET MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A mes parents,

A mes soeurs,

A Chaton,

A tous mes amis.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547621_0030

A notre jury de thèse:

Monsieur le Professeur Douste-Blazy,

Monsieur le Professeur Rico,

Monsieur le Professeur Bézille.

A Monsieur le Professeur Braun

et

à l'ensemble du personnel du laboratoire de physique et chimie biologiques et médicales de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

A Monsieur Soula,

A Monsieur Canal.

INTRODUCTION

Dans la pratique vétérinaire courante, l'intérêt diagnostique des Phosphatases Alcalines (PAL) E.C. 3.1.3.1. est assez limité chez les ovins en raison de la distribution ubiquitaire de ces enzymes et de leur concentration hépatique relativement faible. Il en découle que les PAL sériques totales sont peu exploitées dans cette espèce.

Dans le cadre d'expérimentations liées à l'étude du Darmous, une fluorose hydro-tellurique au Maroc, on a pu observer chez ovins et bovins des accroissements non négligeables des PAL totales alors que classiquement les ions fluorure sont réputés inhibiteurs de ces enzymes. Pour tenter d'éclaircir cette situation, il paraissait nécessaire de séparer les différentes fractions des PAL, pour déterminer ultérieurement l'origine de l'accroissement.

La bibliographie concernant les fractions des PAL étant assez limitée, nous avons entrepris une expérimentation visant à tester la validité de méthodes de routine pour la séparation des fractions des PAL. Il en résulte le plan de cette étude: après un rappel bibliographique, nous exposerons successivement le protocole expérimental suivi et les résultats obtenus; ces derniers seront discutés dans une quatrième et dernière partie.

Organes	6	3
Foie	100	100
Rein	183,6	508,3
Intestin	-	552,4
Os	-	77,4
Placenta	-	61,8
Surrénale	456,8	-
Utérus	429,5	-
Erythrocytes	140	-
Cerveau	52,7	-
Rate	28,6	57,9
Poumon	19,6	112,9
Vaisseaux sanguins	15,9	-
Rumen	7,7	-
Thyroïde	6,8	-
Coeur	4,1	-
Muscle squelletique	0,9	-

Tableau n°1:
Distribution des PAL dans les organes des ovins.
Les activités de chaque organe sont exprimées en pourcentage de l'activité hépatique, D'après Baetz (6) et Antonov (3).

1° PARTIE: BIBLIOGRAPHIE.

La littérature concernant les phosphatases alcalines du mouton est relativement peu abondante et assez disparate. Nous présentons ci-après, un essai de synthèse articulé en deux parties:

1) PAL dans les organes puis dans le plasma et l'urine, en laissant volontairement de côté les autres fluides biologiques.

2) "isoenzymes" de PAL.

1. PAL TOTALE.

1.1. DISTRIBUTION.

1.1.1. DANS LES ORGANES.

Les phosphatases alcalines sont des enzymes très ubiquitaires (3, 6). Les résultats sont donnés dans le tableau n°1 où pour faciliter la comparaison, les résultats exprimés à l'origine dans des unités impossibles à comparer ont été transposés en pourcentage de l'activité hépatique: les tissus les plus riches sont les surrénales, l'utérus, le rein, principalement le cortex (8), la muqueuse de l'intestin grêle. Dans cette dernière, on note un gradient descendant du duodénum à l'iléon, alors que dans d'autres espèces, bovins, équins, le maximum est situé dans le jéjunum (43).

Le foie du mouton ne contient que peu de PAL, contrairement à celui de l'homme et du chien par exemple, d'où le manque d'intérêt de cette enzyme en sémiologie hépatique chez le mouton (2, 8, 9, 27).

Chez les ovins, comme chez les autres ruminants et l'homme la PAL leucocytaire est localisée dans les neutrophiles alors que chez le cheval elle est située aussi dans les éosinophiles (5).

Le taux de PAL du tractus génital de la femelle est hormono-dépendant (11, 22, 23, 32, 34, 35, 41, 42): dans l'endomètre il chute de façon significative après l'ovulation (22). Il a été montré que l'activité de PAL est régulée par la progestérone, et que chez la brebis, les oestrogènes sont sans effet (41), contrairement à ce qui est observé chez la femme .

âge	n	m ± σ	U	Réf.
8-9 mois	7	126 ± 19	U/l	16
8-9 mois	7	131 ± 16	U/l	16
8-9 mois	108	128 ± 49	U/l	17
1 an	75	234 ± 13,2	U/l	15
2 ans	177	125 ± 4,4	U/l	15
nouveau-né	-	24,3 ± 3,45	mkat/l.	20
"	44	1217 ± 64,8	U/l	15
"	6	820 ± 140	U/l	13

Tableau n°2:
Valeurs usuelles de la PAL sérique, chez les ovins adultes et les agneaux à la naissance.

races		groupes sanguins R	r	i
Mérinos	m	193	316	-
	σ	12	13	-
	n	81	40	-
Southdown	m	96	157	115
	σ	3,2	14	11,5
	n	60	20	39
Cheviot	m	82	154	90
	σ	3,3	5,1	8,7
	n	66	42	12

Tableau n°3:
Effets de la race et du groupe sanguin sur la PAL sérique des ovins, d'après Healy (15).

1.1.2. LOCALISATION CELLULAIRE.

Par histo-enzymologie on peut montrer une forte activité dans les bordures en brosses des cellules des villosités intestinales (21, 24) et des tubules rénaux proximaux (36 ,37), dans l'endomètre et les glandes superficielles utérines, dans la zone pellucide des follicules ovariens (10), dans les épithéliums vaginal et cervical (35).

1.2. PAL PLASMATIQUE.

1.2.1. VALEURS USUELLES.

Le tableau n°2 donne les valeurs relevées dans la littérature, dans la mesure où elles sont exprimées dans le système international d'unités.

1.2.2. FACTEURS DE VARIATIONS.

1.2.2.1. VARIATIONS PRE-ANALYTIQUES ET ANALYTIQUES.

Aucune étude systématique ne semble avoir été entreprise et nous ne disposons donc que de quelques renseignements épars.

1.2.2.1.1. VARIATIONS PRE-ANALYTIQUES.

N'ont été étudiés, à notre connaissance que les effets suivants:

- conditions de prélèvement.

Le prélèvement est toujours effectué à la jugulaire.

Le transport de l'animal ou l'exercice n'ont pas d'effet sur l'activité sérique de la PAL (12).

- traitement de l'échantillon.

Les dosages sont effectués sur sérum en général, plus rarement sur plasma, mais aucune comparaison n'a été faite chez les ovins.

Les effets du stockage sont minimes:

.sur le sérum conservé 48h à +4, +20, +37°C aucune perte d'activité n'est observée (12).

.après congélation à -10°C pendant 4 mois la perte d'activité est seulement de 5% (12).

1.2.2.1.2. VARIATIONS ANALYTIQUES.

Aucune étude systématique des variations analytiques n'a été effectuée chez le mouton et il est probable que les effets observés sur les mesures des PAL plasmatiques de l'homme sont transposables (40). Chez le mouton, il a été montré que les mesures peuvent être effectuées indifféremment avec le p-nitrophénylphosphate ou le phénylphosphate comme substrat et que les valeurs obtenues avec le second substrat sont près de deux fois supérieures (12).

1.2.2.2. VARIATIONS BIOLOGIQUES.

1.2.2.2.1. INTER-INDIVIDUELLES.

- Age.

Chez le nouveau-né, la concentration en PAL est trés élevée. On note un pic d'activité à 12h, puis à 48h la concentration en PAL redevient voisine de celle observée à la naissance (19, 20).

Durant les 6 premiers mois environ, l'activité baisse rapidement (7), puis plus lentement jusqu'à l'âge de 2 ans (15).

- Sexe.

Chez l'adulte et le nouveau-né, l'activité PAL est supérieure chez le mâle, mais la différence n'est pas statistiquement significative (12, 25).

- Race.

Des dosages ont été effectués à l'aide de la même technique analytique dans de nombreux races et croisements (15). Les différences sont parfois importantes, on observe par exemple que les moutons de race Cheviot ou Southdown ont une activité sérique moitié moindre que les Mérinos (tableau n°3).

- Groupes sanguins.

Parmi les trois groupes sanguins du mouton R, r et i, on note que les moutons du groupe r ont une activité sérique PAL significativement plus élevée que ceux des groupes R et i (tableau n°3).

La différence serait liée à une ou plusieures isoenzymes thermorésistantes supplémentaires chez les moutons du groupe r (15, 17, 18, 19).

1.2.2.2.2. INTRA-INDIVIDUELLES.

- Alimentation - saison.

L'activité sérique de PAL est liée à la croissance. Si celle-ci est favorisée (ration supplémentée, printemps) la concentration en PAL est plus élevée (12, 16). Inversement si le mouton est carencé, lors d'une parasitose par exemple, la perte de poids s'accompagne d'une diminution de l'activité PAL (31, 33).

La carence en zinc se traduit aussi par une baisse de l'activité PAL et celà avant même l'apparition des signes cliniques de carence en zinc (4, 29).

Cette relation positive entre croissance et activité PAL est probablement aussi valable in utero car un nouveau-né plus lourd à la naissance présente une plus grande concentration sérique de PAL (25).

Une complémentation favorisant l'absorption des triglycérides fait augmenter l'activité PAL, plus particulièrement une fraction résistante à la chaleur (17).

- Gestation - lactation.

Chez la jeune brebis, on observe deux augmentations de l'activité PAL, la première vers la 34° s (démarrage de la fonction ovarienne), la deuxième vers la 45° s (conception) (1).

Chez quelques brebis on note, comme chez la femme, une augmentation de la concentration en PAL en fin de gestation mais cela n'est pas statistiquement significatif (12). Par contre la PAL augmente après l'agnelage (18).

1.3. PAL URINAIRE.

Dans l'urine, l'activité PAL est de 17,2 U Sigma/h (36). Cette activité est nettement augmentée lors de lésions expérimentales des tubules proximaux. Par exemple lors d'injection IV de chlorure mercurique à la dose de 0,25 mg/kg PV, cette hausse est nette dès la première heure suivant l'injection (36, 37). Le dosage de la PAL urinaire permet donc un dépistage précoce des souffrances rénales (tubules proximaux).

2. "ISOENZYMES".

Nous considèrerons en parallèle les méthodes de fractionnement et leurs résultats.

2.1. THERMO-DENATURATION.

Cette méthode exploitée en particulier par Moss (30) consiste à soumettre le sérum ou l'homogénat de tissu à une température de 56°C puis à doser l'activité résiduelle après différents temps d'incubation.

D'autres auteurs ont proposé d'utiliser d'autres températures, en particulier 60°C pour les fractions les plus résistantes (placenta, tumeurs).

Les résultats sont exprimés:

- soit par le pourcentage d'activité résiduelle à un temps et une température donnés.
- soit par la courbe de dénaturation. On représente en général la variation du logarithme du pourcentage d'activité restante en fonction du temps à une température constante (figure n°1).

Les résultats obtenus pour le mouton par différents auteurs sont reportés dans le tableau n°4.

La fraction la plus thermo-résistante est celle de l'intestin, suivie par celles du foie puis du placenta, les fractions rénale et osseuse étant thermo-labiles (3, 13, 15, 18).

La PAL du lait a une thermo-sensibilité moyenne, comparable à celle du foie (28).

Notons à titre de comparaison que chez l'homme, la fraction la plus résistante est celle du placenta.

Organes	% activité restante 10 min à 58°C	% activité détruite 10 min à 56°C
Os	19 ± 2,58 n = 6	75 ± 3,7 n = 13
Rein	37 ± 2,17 n = 6	74 ± 4 n = 11
Foie	61 ± 2,76 n = 6	56,5 ± 5,4 n = 12
Poumon	-	54 ± 7 n = 7
Rate	-	54 ± 7 n = 7
Placenta	-	53,8 ± 4,5 n = 7
Duodénum	64 ± 6,07 n = 6	
Jéjunum	75 ± 5,8 n = 6	32,1 ± 2,9 n = 12
Iléon	83 ± 4,9 n = 6	
Références	15	3

Tableau n°4:
rmo-dénaturation de la PAL de différents organes du mouton d'après Healy (15) et Antonov (3).

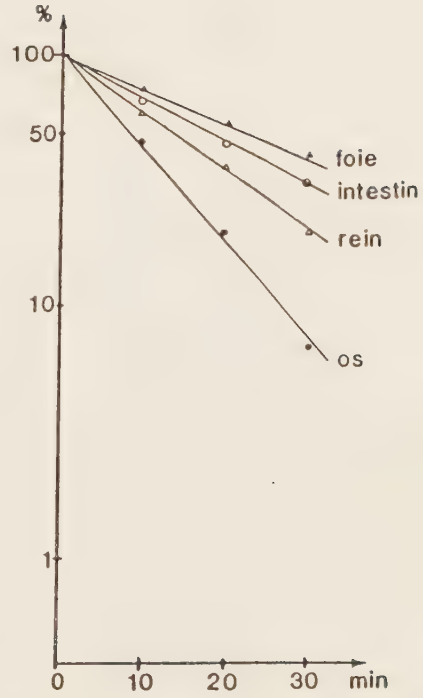


Figure n°1:
Principe de thermo-dénaturation des isoenzymes de la PAL: organes de l'homme, d'après D. Moss (30).

Organes	% inhibition				
	L-phénylalanine	L- arginine	imidazole	L-homoarginine	Urée
Foie	14,8 ± 2,7 n = 30	41,0 ± 2,2 n = 30	75,0 ± 2,3 n = 13	80,5 ± 2,3 n = 12	60,5 ± 2,7 n = 17
Poumon	22,2 ± 1,9 n = 22	44,6 ± 3,7 n = 21	66,9 ± 3,7 n = 10	82,2 n = 4	76,0 ± 5,0 n = 8
Rate	27,6 ± 2,7 n = 18	41,7 ± 3,0 n = 15	62,2 ± 4,4 n = 9	78,2 n = 4	58,0 ± 7,6 n = 7
Rein	14,9 ± 2,7 n = 30	44,3 ± 3,1 n = 24	70,0 ± 2,8 n = 12	86,0 ± 4,0 n = 8	75,4 ± 4,0 n = 17
Intestin	42,8 ± 2,1 n = 24	17,5 ± 2,2 n = 20	41,0 ± 3,5 n = 10	13,6 ± 3,3 n = 6	54,6 ± 4,3 n = 16
Os	19,4 ± 1,8 n = 23	47,4 ± 2,1 n = 23	74,1 ± 4,1 n = 10	87,2 ± 2,9 n = 8	75,9 ± 4,2 n = 10
Placenta	23,5 ± 2,9 n = 9	35,2 ± 3,3 n = 9	58,8 ± 3,8 n = 9	81,3 n = 2	80,0 ± 2,5 n = 4

Tableau n°5:
Effet d'inhibiteurs chimiques sur les PAL de différents organes du mouton d'après S. Antonov (3).

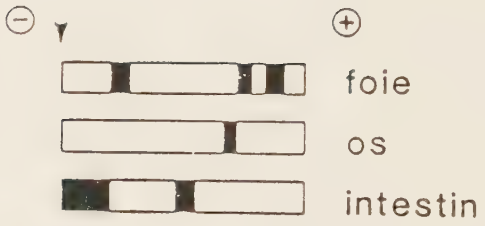


Figure n°2:
Séparation des formes moléculaires de PAL de différents organes du mouton en gel de polyacrylamide d'après Healy (18).

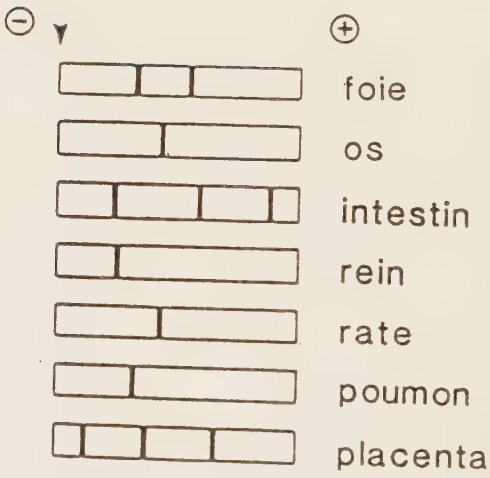


Figure n°3:
Séparation des formes moléculaires de PAL de différents organes du mouton en gel d'agarose d'après Antonov (3).

La flèche indique l'endroit du dépôt.

2.2. INHIBITEURS CHIMIQUES.

Différents agents tels que phénylalanine, urée, L-homoarginine diminuent l'activité de la PAL totale en inhibant plus ou moins l'une ou l'autre des fractions (3, 13, 15, 18).

On exprime les résultats soit par le pourcentage d'activité restante, soit par le pourcentage d'inhibition. Les résultats obtenus chez le mouton sont reportés dans le tableau n°5.

La phénylalanine inhibe plus particulièrement la fraction intestinale chez le mouton comme chez l'homme .La L-homoarginine a une forte action inhibitrice sur toutes les fractions tissulaires étudiées, excepté l'os.

2.3. ELECTROPHORESE.

En medecine humaine, on utilise de nombreux supports: acétate de cellulose, agarose, gel de polyacrylamide...

Cette méthode de fractionnement a été étudiée chez le mouton par Healy, il emploie comme support le gel de polyacrylamide (14, 18), ses résultats sont donnés dans la figure n°2. Sur ce même support la PAL du lait donne deux bandes (28).

D'autres auteurs utilisent le gel d'agarose (3): le foie, le placenta et l'intestin donnent plusieures bandes alors que l'os, le rein, la rate et le poumon en donnent une seule (figure n°3).

En bilan, ces mêmes méthodes appliquées à des sérums permettent de déterminer la ou les fractions responsables des augmentations d'activité.

A la naissance, la fraction osseuse est prédominante, mais le pic d'activité observé à 12h est dû à la fraction intestinale (13). La grande activité des sérums des individus du groupe sanguin r est due à des fractions intestinales supplémentaires (18).

2° PARTIE: PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

1. ANIMAUX.

Les prélèvements d'organes sont effectués à l'abattoir, au maximum 1 heure, après l'abattage sur des animaux sains (examens ante- et post-mortem satisfaisants).

Cinq nouveau-nés et cinq femelles adultes (trois au moment de la mise-bas, une vide et une pleine de cinq mois) de différents services de l'Ecole sont utilisés pour les prélèvements sanguins, après un examen clinique s'assurant de leur bon état de santé. Les prises de sang chez les nouveau-nés sont effectuées peu de temps après la mise-bas et avant la tétée du colostrum.

2. PRELEVEMENTS.

2.1. ORGANES.

2.1.1. NATURE ET NOMBRES.

- os: épiphyse de 1'os canon (3).
- rein: cortex (4).
- foie: lobe de Spiegel (5).
- duodénum: 20 cm à proximité de la caillette (5).
- utérus vides: (2).
- utérus gravides: cotylédons, zones inter-cotylédonaires, placenta (2).
- placenta à terme: prélèvement lors de la délivrance naturelle des brebis (2).

2.1.2. HOMOGENEISATION.

La méthode employée a été mise au point par Métais (communication personnelle) pour 1'os, nous avons conservé la même pour les autres organes pour pouvoir comparer les résultats.

L'homogénéisation est faite dans du soluté isotonique de chlorure de sodium en présence de Triton X 100 à 15 %, à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter-Elvejhem, réfrigéré dans un bain de glace. Pour chaque prélèvement, nous avons effectué 2 ou 4 homogénats différents de 500 à 1000 mg pour 5 ml de solution. Puis les homogénats sont centrifugés 10 min à 4000 g, pour faire sédimenter les particules les plus lourdes.

Les mesures sont effectuées sur le surnageant, ou la fraction intermédiaire si la couche lipidique est importante (cas de l'os, par exemple).

2.2. PLASMA.

Les prélèvements sanguins sont effectués à la jugulaire, sur tube hépariné; les plasma sont séparés après une centrifugation de 5 min à 4000 g dans l'heure suivant la prise de sang.

3. MESURE DE LA CONCENTRATION CATALYTIQUE DE PAL.

Les mesures de la PAL totale et la thermo-dénaturation sont effectuées dans les 24 heures suivant la préparation de l'homogénat ou la prise de sang; l'électrophorèse est réalisée sur des prélèvements conservés à -18° C.

3.1. PAL TOTALE.

La méthode employée est celle recommandée par la SFBC. Le substrat utilisé est du nitro-4 phénylphosphate (38, 39).

Chaque mesure a été effectuée en double. Le contrôle d'exactitude repose sur l'utilisation de sérums du commerce (Lyotrol-bioMérieux).

3.2. FRACTIONS.

3.2.1. THERMO-DENATURATION.

Le protocole suivi est celui de Moss, les temps d'incubation à 56°C sont de 5, 10, 15, ... 35, 45, 60 min.

Pour chaque prélèvement on trace la courbe de thermo-dénaturation.

3.2.2. ELECTROPHORESE.

Deux types de supports ont été utilisés:

- acétate de cellulose, avec un tampon Véronal-Tris (pH = 8,8, I = 0,066). Migration 20 min à 180 V (laboratoire Héléna).
- agarose, tampon Véronal-Tris (pH = 9,2, I = 0,05). Migration 60 min à 150 V (laboratoire Sébia).

Les procédures suivies sont celles recommandées par les fabricants.

Sur gel d'agarose des essais ont été faits après dialyse des homogénats et des plasma contre le tampon utilisé pour l'électrophorèse, pendant 2 et 18 heures.

On représentera l'électrophorégramme.

3° PARTIE: RESULTATS.

1. PAL TOTALE.

Le tableau n°6 regroupe les concentrations d'activité catalytique de PAL mesurées dans les différents organes et les plasma. Les résultats sont exprimés par la moyenne et l'écart-type lorsque cela est possible; à défaut, les différentes valeurs observées sont données.

Les organes les plus riches sont le cortex rénal puis l'os.

On note que, dès la naissance, la PAL plasmatique chez le nouveau-né est trés élevée.

2. FRACTIONS.

2.1. THERMO-DENATURATION.

2.1.1. ORGANES.

Dans les figures n°4 à 11, on a représenté pour chaque organe les différentes cinétiques observées, ainsi que les moyennes des précédentes.

La figure n°12 permet de comparer les pentes moyennes: dans l'ordre de sensibilité croissante à la chaleur nous avons les fractions duodénale, hépatique, rénale, osseuse, placentaire et utérine, comme le montre le tableau n°7 qui donne les temps de demi-vies.

2.1.2. PLASMA.

Les figures n°13 et 14 représentent les cinétiques de dénaturation de la PAL plasmatique chez les nouveau-nés et les femelles adultes: chez les nouveau-nés la PAL est plus sensible à la chaleur.

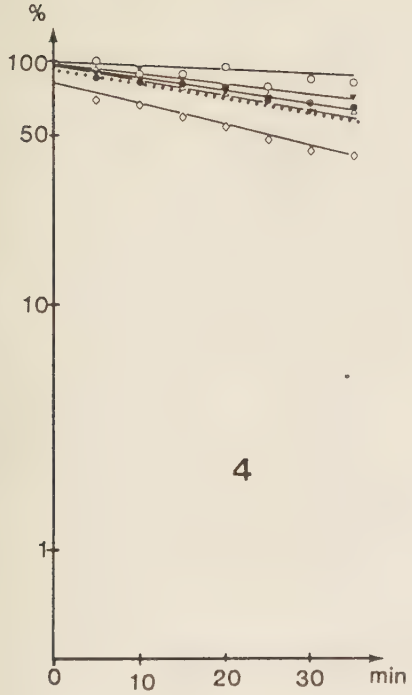
2.2. ELECTROPHORESE.

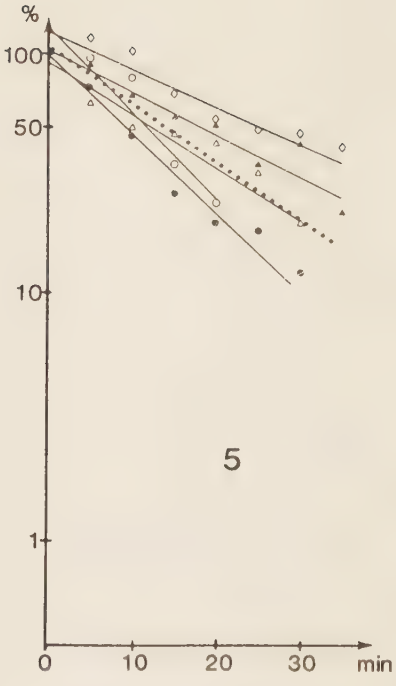
La figure n°15 représente les résultats obtenus sur acétate de cellulose, la figure n°16 ceux obtenus en gel d'agarose après dialyse de deux heures (sans dialyse, les zones de migration étaient encore plus étendues).

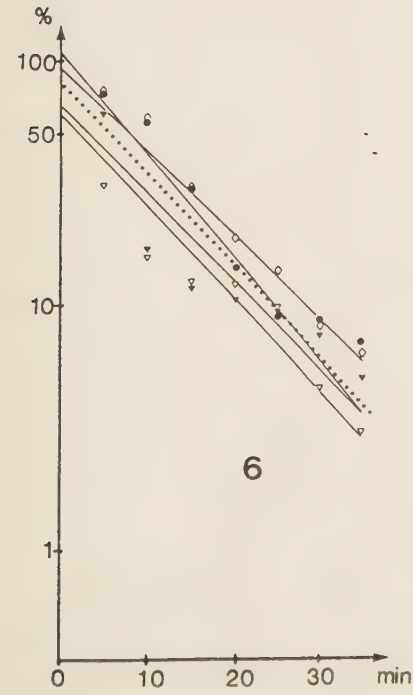
Organe	n	m ± σ	limites
Foie	5	7,8 ± 4,2	3,6 - 12,3
Duodénum	5	7,4 ± 2,7	4 - 10,5
Rein	4	86,8 ± 18,6	62,8 - 108
Os	3	38,8 ± 7,3	31,1 - 45,5
Placenta	4	0,39 ± 0,27	0,08 - 0,64
Utérus vide	2	-	9,7 - 13,3
Utérus plein:			
- cotylédon	2	-	19,5 - 27
- zone inter-cotylédonaire	2	-	3 - 4

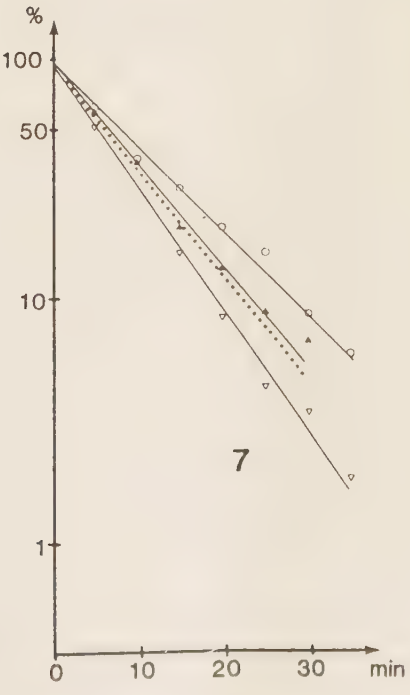
Plasma:	n	m ± σ	limites
Agneau	5	1280 ± 880	540 - 2660
Mère	5	60 ± 12	45 - 73

Tableau n°6:
Valeurs de la PAL mesurées dans les homogénats d'organe et les plasma.

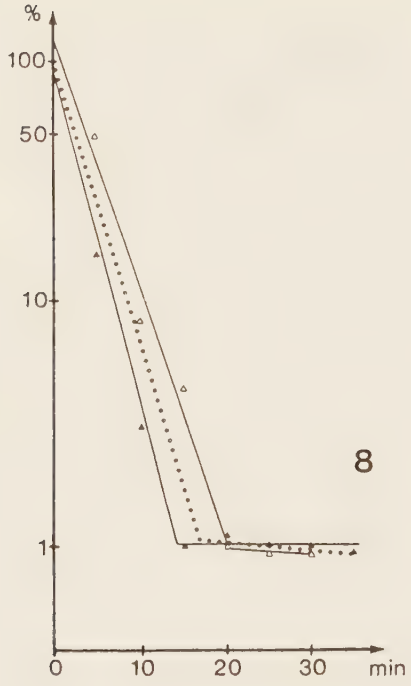


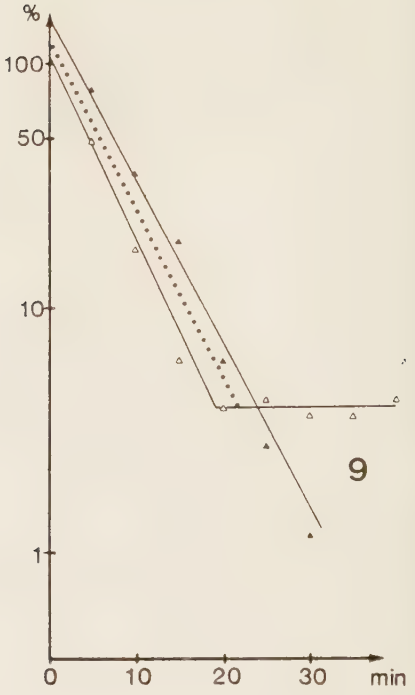


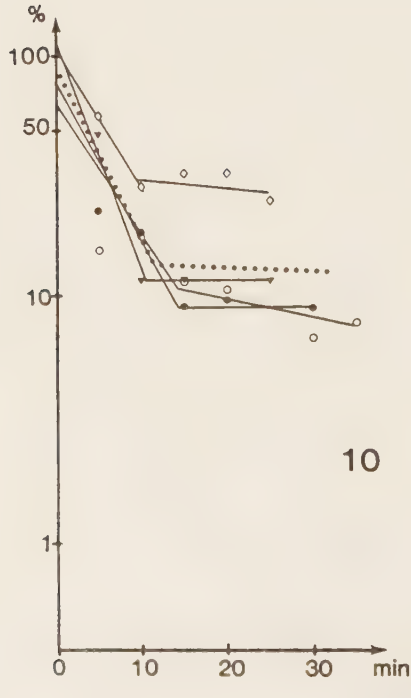


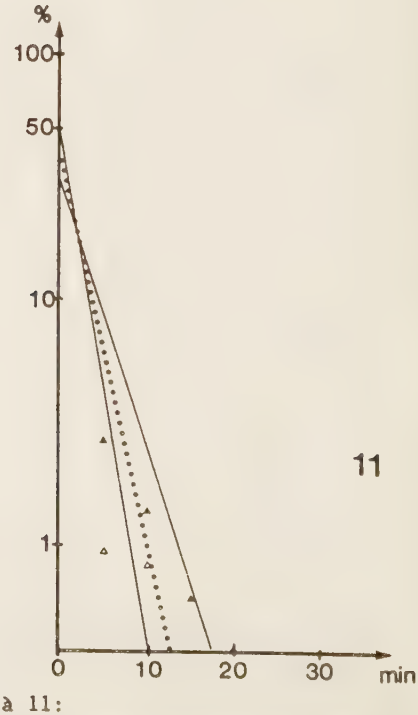


Figures n°4 à 7:
Cinétiques de thermo-dénaturation de la PAL du duodénum (4),du foie (5), du rein (6) et de l'os (7). Les cinétiques individuelles sont représentées par un trait plein et la cinétique moyenne par un trait pointillé.









Figures n°8 à 11:
Cinétiques de thermo-dénaturation de la PAL des cotylédons (8),de la zone inter-cotylédonaire (9), du placenta (10) et de l'utérus vide (11). Les cinétiques individuelles sont représntées par un trait plein et la cinétique moyenne par un trait pointillé.

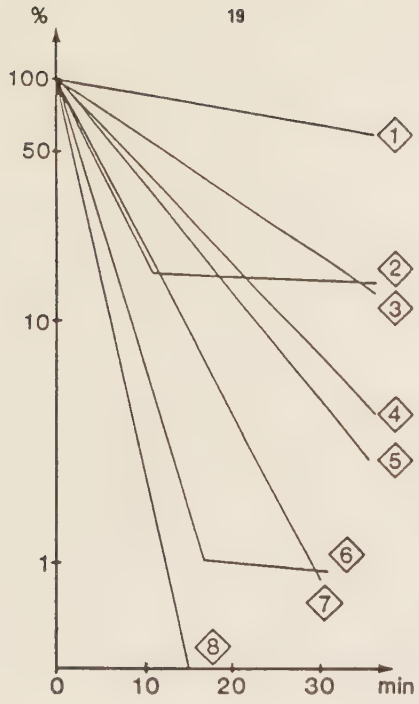
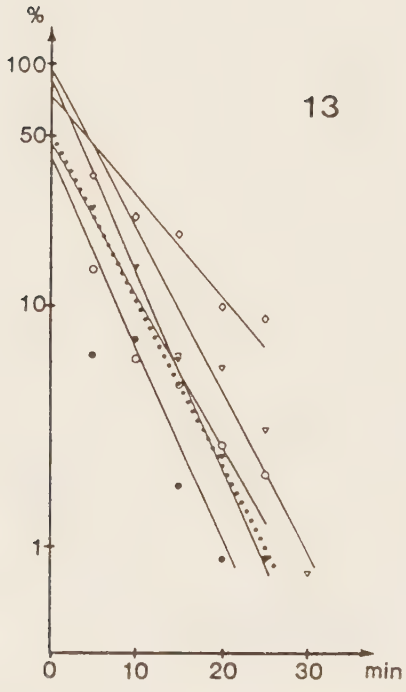
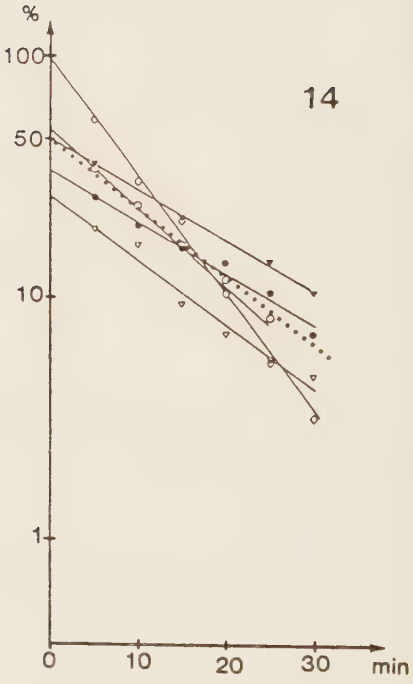


Figure n°12:
Comparaison des cinétiques moyennes de thermo-dénaturation de la PAL des organes du mouton: duodénum (1), placnta (2), foie (3), rein (4), os (5), cotylédons (6), zone inter-cotylédonaire (7) et utérus vide (8).

Organes	demi-vie (min)
Duodénum	49
Foie	12,5
Rein	8
Os	7
Placenta	4
Zone inter-cotylédonaire	4,5
Cotylédon	2,5
Utérus vide	1,8

Tableau n°7:
Demi-vies à 56°C des PAL de différents organes du mouton.





Figures n°13 et 14:
Cinétiques de thermo-dénaturation de la PAL plasmatique chez les nouveau-nés (13), et les femelles adultes (14). les cinétiques individuelles sont représentées par un trait plein et la cinétique moyenne par un trait pointillé.

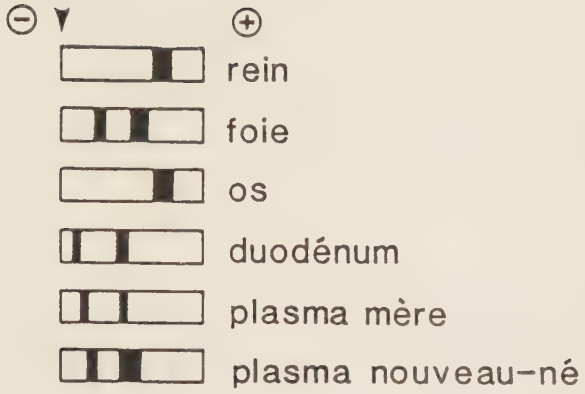


Figure n°15:
Electrophorèse sur acétate de cellulose de la PAL des organes et du plasma du mouton.

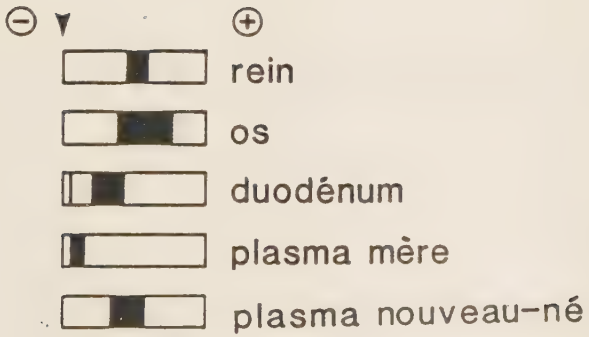


Figure n°16:
Electrophorèse en gel d'agarose de la PAL des organes et du plasma du mouton.

La flèche indique l'endroit du dépôt.

* Acétate de cellulose:

Il apparait que la séparation est meilleure sur acétate de cellulose qu'en gel d'agarose. Néanmoins, il semble impossible de distinguer les fractions osseuse, rénale et hépatique rapide, quant à la fraction duodénale rapide sa migration est intermédiaire entre celle des deux fractions hépatiques.

Par conséquent l'interprétation des électrophorégrammes de plasma reste difficile. Cependant ils comportent deux bandes: la plus lente est quasiment identique chez l'adulte et le nouveau-né, la plus rapide est plus intense et étalée chez le nouveau-né et sa migration se rapproche davantage de celle de la fraction hépatique rapide que de celle des fractions osseuse ou rénale.

* Gel d'agarose:

Nous avons aussi obtenu deux fractions duodénales, la plus rapide étant difficilement séparable des fractions osseuse et rénale. N'ayant jamais pu obtenir d'image nette de l'isoenzyme hépatique l'interprétation des électrophorégrammes de plasma n'est pas possible. Il faut quand même noter que ces derniers ne comportent qu'une bande, à migration lente pour la femelle et plus rapide pour le nouveau-né (au niveau de la fraction osseuse en particulier).

4° PARTIE: DISCUSSION.

1. PAL TOTALE.

1.1. ORGANES.

Les valeurs absolues de nos résultats de mesure de l'activité catalytique de PAL et celles des résultats précédemment publiés ne sont pas directement comparables. Par contre nous pouvons comparer les valeurs relatives: comme d'autres auteurs (cf. tableau n°1), nous trouvons que le rein est particulièrement riche en PAL, que le foie en contient peu.

Par rapport aux résultats de S.Antonov (3), nous mettons en évidence une plus grande concentration d'activité de PAL dans l'os, l'utilisation d'une méthode de préparation des échantillons mieux adaptée à l'os explique peut-être cette différence.

Les organes pour lesquels nos résultats diffèrent le plus de ceux des publications précédentes sont l'intestin et l'utérus. Une différence de méthode permet sans doute d'expliquer cette divergence de résultats: nos mesures portent sur des fragments d'organe comprenant muqueuse et musculeuse, et non pas comme dans les autres travaux uniquement sur de la muqueuse.

1.2. PLASMA.

Ici non plus, nous ne pouvons comparer directement les valeurs absolues de nos résultats avec celles des publications antérieures. Nous retrouvons cependant des valeurs plasmatiques environ 10 fois plus élevées chez le nouveau-né.

2. FRACTIONS.

2.1. THERMO-DENATURATION.

2.1.1. ORGANES.

L'ordre de sensibilité à la chaleur est identique dans l'ensemble à ceux publiés précédemment dans la littérature (cf. tableau n°4).

Une exception notable est le cas de la fraction placentaire qui d'après S.Antonov (3), est moyennement résistante, puisque selon cet auteur, après 10 min à 56°C il reste 46 % d'activité. Or nous l'avons trouvée très thermo-labile dans la première partie de sa cinétique de dénaturation, puis dans un deuxième temps elle reste stable à 56°C avec

encore 14 % de l'activité initiale. Mais les résultats relevés dans la littérature et les nôtres vont cependant dans le même sens: la fraction placentaire chez les ovins ne se caractérise pas par sa thermo-résistance élevée, comme chez l'homme.

La fraction utérine, quel que soit l'état physiologique de la femelle, se montre particulièrement thermo-labile.

Les fractions rénale et osseuse ont une thermo-sensibilité voisine, proche aussi de celle de la fraction hépatique, et en pratique on ne peut espérer faire la différence entre ces trois fractions. Par contre la PAL duodénale se distingue nettement par sa résistance à la chaleur.

2.1.2. PLASMA.

L'activité plasmatique de PAL chez l'agneau à la naissance est plus thermo-labile que celle de la mère, ce qui laisserait penser que son origine est principalement osseuse. En effet, les fractions les plus thermo-sensibles sont placentaire et utérine et ne peuvent, dans les conditions physiologiques franchir les différentes membranes de la placentation épithélio-choriale; par ailleurs, il est peu probable que la composante rénale soit abondante puisque lors de souffrance de cet organe, la PAL est préférentiellement éliminée par l'urine (36, 37).

2.2. ELECTROPHORESE.

Quel que soit le support utilisé, soit par les auteurs cités dans la bibliographie, soit par nous, le rein et l'os donnent une bande, l'intestin et le foie, deux ou plusieures (cf figures n°2, 3, 15 et 16). Mais sur acétate de cellulose comme en gel d'agarose, la séparation des différentes fractions n'est pas suffisante pour pouvoir interpréter de façon satisfaisante sur le plan clinique, un électrophorégramme de plasma.

Sur acétate de cellulose, les plasma de femelles adultes et de nouveau-nés donnent des images assez semblables: la fraction rapide est plus intense chez le nouveau-né, mais sa migration relative la rapproche davantage d'une fraction hépatique rapide que d'une fraction osseuse, ainsi que nous l'avons montré précédemment. Cela est en contradiction avec les résultats de thermo-dénaturation et les expériences assez nombreuses portant sur l'activité PAL de l'agneau (15, 16, 19). Il s'agit probablement d'une incertitude de reproductibilité de migration des différentes fractions.

En gel d'agarose, la PAL plasmatique du nouveau-né présente une mobilité proche de celle de la PAL osseuse (cf. figure n°16), mais l'étendue des zones de migration sur ce support empêche toute interprétation certaine des électrophorégrammes.

Pensant que la méthode d'homogénéisation dans du Triton X 100 à 15 % pouvait peut-être expliquer cette mauvaise séparation, nous avons réalisé des homogénats de foie et de rein simplement dans du sérum physiologique, puis l'électrophorèse a été conduite en gel d'agarose comme précédemment. Les résultats furent identiques aux précédents: pas d'image du foie, bande trés étendue pour le rein.

CONCLUSION.

Il apparait à l'examen des résultats précédemment exposés que le but que nous nous étions fixé n'a pas été atteint d'une manière satisfaisante. Néanmoins, nous avons confirmé les résultats de la littérature pour la distribution des PAL totales dans les organes du mouton.

Pour les formes des PAL, il s'avère que ni la thermo-dénaturation ni les méthodes commerciales d'électrophorèse soit sur acétate de cellulose soit en gel d'agarose, ne sont suffisament résolutives pour permettre de distinguer avec certitude les fractions hépatique et osseuse qui contribuent probablement le plus à l'activité sérique.

Par conséquent, il semble que les travaux gagneraient à être poursuivis par une étude plus fondamentale visant à obtenir une séparation facilement interprétable et reproductible des fractions de la PAL chez le mouton. Outre le bénéfice ainsi apporté au plan de la biologie fondamentale, cela devrait permettre de contribuer à expliciter l'origine des variations des PAL totales chez les ovins souffrant de fluorose.

VU : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Professeur RICO

VU : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

VU : Le Président de la Thèse

Professeur DOUSTE-BLAZY

VU et PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 27-3-1984
Le Président de l'Université Paul Sabatier

Professeur D. BANCEL

REFERENCES.
==========

1 - Abdel-Rahman (H.)
Effect of age, nutrition and gonadotrophic hormone therapy on serum alkaline phosphatase activity in ewe lambs.
Acta. Vet. Acad. Sci. Hung. , 1975, 25, 313-320.

2 - Amelu (P.), Forsyth (G.W.), Searcy (G.P.)
A comparison of parameters used to assess liver damage in sheep treated with carbon tetrachloride.
Can. J. Comp. Med. , 1977, 41, 420-427.

3 - Antonov (S.)
Activity and characteristics of alkaline phosphatase in the cattle and sheep organs.
Vet. Med. Nauki. , 1979, 16, 41-47.

4 - Apgar (J.)
Alkaline phosphatase activity and zinc level in plasma as indicators of zinc status in pregnant and lactating sheep.
Nutr. Rep. Int. , 1979, 19, 371-376.

5 - Atwall (S.), Mc Farland (L.Z.)
Histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in leucocytes of sheep, horses, cow, dog and cat.
Am. J. Vet. Res. , 1967, 28, 971-974.

6 - Baetz (A.L.)
Phosphatases, phosphokinase and transferase in blood and tissues of domestic animals.
Proc. Tech. Chicago, 1969, 163-167.

7 - Bost (J.), Boivin (R.)
Evolution des acides gras non-estérifiés, de la phosphatase alcaline et du glucose sanguins au cours des 4 premiers mois chez l'agneau.
Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon, 1972, 74, 49-54.

8 - Clampitt (R.B.), Hart (R.J.)
The tissue activities of some diagnostic enzymes in ten mammalian species.
J. Comp. Pathol. , 1978, 88, 607-622.

9 - Croker (K.P.), Allen (J.G.), Petterson (D.S.), Masters (H.G.), Frayne (R.F.)
Utilization of lupin stubbles by merino sheep; studies of animal perfomance, rate and time of stocking, lupinosis, liver copper and zinc and circulating plasma enzymes.
Aust. J. Agric. Res. , 1979, 30, 551-564.

10 - El Samannoudy (F.A.), Sharera (A.M.), Ghannudi (S.A.), Gillaly (G.A.), El Mougy (S.A.)
Adverse effects of phytoestrogens -7 Effect of beta-sitosterol treatment on follicular development, ovarian structure and uterus in the immature female sheep.
Cell. Mol. Biol. , 1980, 26, 255-266.

11 - Hafez (E.S.E.), White (I.G.)
Effect of lactation on endometrial and placental enzymes in the rabbit and sheep.
Fertil. Steril. , 1970, 21, 64-67.

12 - Healy (P.J.)
Serum alkaline phosphatase in sheep.
Clin. Chim. Acta , 1971, 33, 431-436.

13 - Healy (P.J.)
Serum alkaline phosphatase in the newborn lamb.
Clin. Chim. Acta , 1971, 33, 437-441.

14 - Healy (P.J.)
Quantitative analysis of serum alkaline phosphatase isoenzyme activity.
Clin. Chim. Acta , 1974, 55, 407-409.

15 - Healy (P.J.)
Serum alkaline phosphatase activity in sheep.
Aust. J. Exp. biol. Med. Sci. , 1974, 52, 375-385.

16 - Healy (P.J.), Mc Innes (P.)
Serum alkaline phosphatase activity in relation to live weight of lambs.
Res. Vet. Sci. , 1975, 18, 157-160.

17 - Healy (P.J.), Davis (C.H.)
An interaction between diet and blood group upon alkaline phosphatase.
Res. Vet. Sci. , 1975, 18, 161-164.

18 - Healy (P.J.)
Isoenzymes of alkaline phosphatase in serum lambs and ewes.
Res. Vet. Sci. , 1975, 19, 120-126.

19 - Healy (P.J.)
Isoenzymes of alkaline phosphatase in serum of newly born lambs.
Res. Vet. Sci. , 1975, 19, 127-130.

20 - Healy (P.J.)
Intestinal brush border and lysosomal enzymes and immunoglobulin absorption in the newly born lamb.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. , 1977, 55, 327-337.

21 - Healy (P.J.), Dinsdale (D.)
Protein transmission in the intestine of the newborn lamb: the involvement of acid and alkaline phosphatase activity.
Histochem. J. , 1979, 11, 289-298.

22 - Javad Zamiri (M.), Blackshaw (A.W.)
Enzyme histochemistry of the sheep uterus during the oestrous cycle.
Aust. J. Biol. Sci. , 1979, 32, 409-414.

23 - Javad Zamiri (M.)
Acid and alkaline phosphatases in histologically defined areas of the sheep uterus and placenta: histochemical and microfluorometric analyses.
Aust. J. Biol. Sci. , 1980, 33, 549-555.

24 - Jones (D.G.)
Changes in the intestinal enzyme activity of lambs during chronic infection with Trichostrongylus vitrinus.
Res. Vet. Sci. , 1982, 32, 316-323.

25 - Khalaf (A.M.), Doxey (D.L.)
Serum alkaline phosphatase values in lambs in relation to prepartu-rient maternal nutrition and litter size.
Vet. Sci. Commun. , 1977, 1, 365-370.

26 - Khayam-Bashi (H.)
Protein fractionation, nucleic acids and enzymatic activity of cytoplasmic extracts from the intestinal mucosa of sheep.
Biochem. Med. , 1979, 21, 40-46.

27 - Knight (R.A.)
Experimental cross infections of Fasciola Hepatica in lambs and calves.
J. Parasitol. , 1978, 64, 601-605.

28 - Linden (G.), Alais (C.)
Alkaline phosphatase in human, cow and sheep milks: molecular and catalytic properties and metal ion action.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. , 1978, 18, 749-758.

29 - Masters (D.G.), Moir (R.J.)
Provision of zinc to sheep by means of an intraruminal pellet.
Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. , 1980, 20, 547-551.

30 - Moss (D.W.)
Isoenzymes , 1 vol., 204 p., 1982, Chapman and Hall , Londres .

31 - Muniz (V.M.M.), Neto (J.M.F.)
Influência da alimentaçao e parasitismo sobre alguns elementos sangüineos em ovinos.
Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais, 1977, 29, 215-224.

32 - Murdoch (B.E.), O'Shea (T.)
Activity of enzymes in the mucosal tissues and rinsings of the reproductive tract of the naturally cyclic ewe.
Aust. J. Biol. Sci. , 1978, 31, 345-354.

33 - Neto (J.M.F.), Sampaio (I.B.M.)
Influência da alimentaçao e do parasitismo gastrintestinal nos teores de Ca, P, Mg e fosfatase alcalina do soro sangüîneo de ovinos.
Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais, 1978, 30, 15-27.

34 - Ramachandraiah (S.V.), Narasimha Rao (P.), Rama Rao (P.), Ramamohana Rao (A.)
Histological, histometrical and histochemical changes in the uterine and oviducal epithelium of ewe during oestrous cycle.
Indian J. Anim. Sci. , 1980, 50, 41-45.

35 - Ramachandraiah (S.V.), Narasimha Rao (P.), Rama Rao (P.), Ramamohana Rao (A.)
Histological, histometrical and histochemical changes in the vaginal and cervical epithelium of ewe during oestrous cycle.
Indian J. Anim. Sci. , 1980, 50, 156-161.

36 - Robinson (M.), Hesketh (A.)
Effect of mercuric chloride on the structure and function of the kidney of sheep.
J. Comp. Pathol. , 1976, 86, 307-318.

37 - Robinson (M.), Trafford (J.)
A study of early urinary enzymatic changes in mercuric chloride nephropathy in sheep.
J. Comp. Pathol. , 1977, 87, 275-280.

38 - SFBC: Commission Enzymologie.
Recommandations pour la mesure de la concentration catalytique des phosphatases alcalines dans le sérum humain à + 30°C.
Ann. Biol. Clin. , 1982, 40, 111-114.

39 - SFBC: Commission Enzymologie.
Informations complémentaires relatives à la méthode recommandée pour la mesure de la concentration catalytique des phosphatases alcalines dans le sérum humain à + 30°C.
Ann. Biol. Clin. , 1982, 40, 114-116.

40 - Siest (G.), Henny (J.), Schiele (F.)
Interprétation des examens de laboratoire, 1 vol., 427 p., 1981, Karger, Basel.

41 - Stone (G.M.), Leigh Murphy , Miller (B.G.)
Hormone receptor levels and metabolic activity in the uterus of the ewe: regulation by oestradiol and progesterone.
Aust. J. Biol. Sci. , 1978, 31, 395-403.

42 - Tang (B.Y.), Adams (N.R.)
Enzyme activities and protein and carbohydrate concentrations in cervical secretions at dioestrus in normal ewes and ewes with permanent phyto-oestrogenic infertility.
Aust. J. Biol. Sci. , 1978, 31, 241-246.

43 - Toofanian (F.), Teshfam (M.)
Alkaline phosphatase activity in the small intestine of the sheep.
Res. Vet. Sci. , 1978, 24, 382-383.

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION.....p. 1

1° PARTIE: BIBLIOGRAPHIE.....p. 3
1. PAL TOTALE.....p. 3
1.1 Distribution.....p. 3
1.1.1. Dans les organes.
1.1.2. Localisation tissulaire.
1.2. PAL plasmatique.....p. 5
1.2.1. Valeurs usuelles.
1.2.2. Facteurs de variations.
1.2.2.1. Variations pré-analytiques et analytiques.
1.2.2.2. Variations biologiques.
1.3. PAL urinaire.....p. 7

2. "ISOENZYMES".....p. 7
2.1. Thermo-dénaturation.....p. 7
2.2. Inhibiteurs chimiques.....p. 11
2.3. Electrophorèse.....p. 11

2° PARTIE: PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....p. 13
1. ANIMAUX.....p. 13

2. PRELEVEMENTS.....p. 13
2.1. Organes.....p. 13
2.1.1. Nature et nombres.
2.1.2. Homogénéisation.
2.2. Plasma.....p. 14

3. MESURE DE LA CONCENTRATION CATALYTIQUE DE PAL.....p. 14
3.1 PAL Totale.....p. 14
3.2. Fractions.....p. 14
3.2.1. Thermo-dénaturation.
3.2.2. Electrophorèse.

3° PARTIE: RESULTATS.....p. 15
1. PAL TOTALE.....p. 15
2. FRACTIONS.....p. 15
2.1. Thermo-dénaturation.....p. 15
2.2. Electrophorèse.....p. 15

4° PARTIE: DISCUSSION.....p. 23
1. PAL TOTALE.....p. 23
1.1. Organes.....p. 23
1.2. Plasma.....p. 23
2. FRACTIONS.....p. 23
2.1. Thermo-dénaturation.....p. 23
2.1.1. Organes.
2.1.2. Plasma.
2.2. Electrophorèse.....p. 24

CONCLUSION.....p. 25

REFERENCES.....p. 29

Imp. Corep - 21, rue Viguerie - 31300 Toulouse - Tél. : 42.01.19